



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA**

**FACOLTA' DI FARMACIA**

**Corso di Laurea Specialistica in Farmacia**

Tesi di Laurea:

**CONTROLLO DELLO STRESS OSSIDATIVO: NUOVE  
STRATEGIE TERAPEUTICHE**

**Relatore:**

Prof.ssa Annalina Lapucci

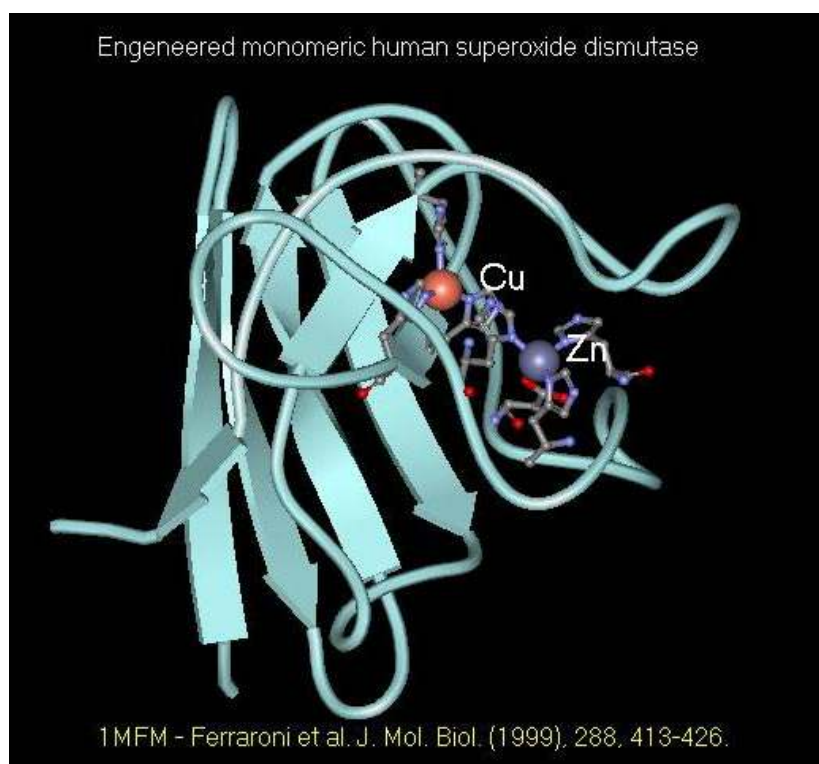
**Candidato:**

Marco Palagi

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

## INTRODUZIONE

I radicali dell'ossigeno hanno una lunga storia <sup>(1)</sup>. Fenton ha scoperto ciò che è noto come “reagente di Fenton” più di 100 anni fa, e la chimica delle radiazioni ha dimostrato che le radiazioni ionizzanti generano superossido ( $O_2^{\cdot -}$ ) e radicale idrossile ( $\cdot OH$ ). Tuttavia, la comprensione dell'origine biologica di questi radicali è relativamente recente: nel 1960, Fridovich e Handler hanno riferito che  $O_2^{\cdot -}$  è prodotto da una reazione enzimatica nel sistema xantina ossidasi, e auto-ossidazione dei lipidi. McCord e Fridovich successivamente hanno trovato che la superossido dismutasi (SOD, **Figura 1**) converte  $O_2^{\cdot -}$  in perossido di idrogeno.



**Figura 1.** Struttura cristallografica a raggi X della SOD (superossido dismutasi) umana

E' ormai noto che molti enzimi tra cui la xantina ossidasi, la NADPH ossidasi, e gli enzimi del citocromo P-450, la D-amino acido ossidasi, la D-

glucosio ossidasi, l'ossido nitrico sintetasi (NOS), la mieloperossidasi, generano radicali ossigeno e azoto, che sono le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS), rispettivamente.

Altre fonti ben note di produzione di ROS nei sistemi biologici comprendono i metalli di transizione come il rame e il ferro, nonché la perdita di elettroni del normale sistema di trasporto degli elettroni mitocondriali.

In aggiunta agli enzimi che generano ROS, molti enzimi antiossidanti tra cui, catalasi, glutatione perossidasi, e EME ossigenasi (HO) -1, così come i membri della famiglia delle tioredoxine, svolgono ruoli cruciali di difesa contro lo stress ossidativo nei sistemi cellulari.

Le proteine metallo-chelanti come la ferritina e la transferrina hanno un ruolo simile, come rimuovere il ferro libero nel plasma dei mammiferi.

Questi sistemi di difesa sono ormai ritenuti di importanza cruciale.

A causa della estrema reattività delle ROS, le reazioni chimiche di questi ultimi con le proteine e gli acidi nucleici (DNA, RNA) e le risultanti modificazioni funzionali di queste molecole sono normali eventi cellulari.

L'impatto biologico delle ROS è chiaramente senza eguali rispetto a quello delle molecole tradizionali, in particolare in termini di patogenesi. Tuttavia, l'emivita estremamente breve delle ROS, da millisecondi a nanosecondi, rende arduo l'isolamento e la purificazione. Lo sviluppo della spettroscopia di risonanza di spin elettronico ESR, anche nota come risonanza paramagnetica elettronica spettroscopica (EPR, **Figura 2**), ha reso possibile dimostrare la presenza delle ROS.

Più tardi l'uso di agenti spin-trapping (agenti intrappolatori di radicali liberi) che reagiscono con i radicali per generare addotti stabili, ha reso facile la misurazione delle ROS.



**Figura 2.** Spettrometro per risonanza paramagnetica elettronica (EPR)

Le prime indagini sui danni al DNA o alle proteine mediante raggi X e radiazioni UV hanno rivelato che tali specie radicali sono altamente dannose per i sistemi biologici a livello molecolare e cellulare.

Un classico esempio di questo tipo di danno al DNA è il dimero di timina, un prodotto ben caratterizzato.

Ormai le ROS sono ritenute tra le molecole più importanti in una serie di funzioni fisiologiche quali la , fertilizzazione, l' embriogenesi, lo sviluppo, la morfogenesi, la patogenesi, le infezioni microbiche, le infiammazioni, la mutazione, la carcinogenesi, la fisiopatologia vascolare, il metabolismo dei farmaci, l' ipertensione, il regolamento di reazioni enzimatiche, e la vie di trasduzione del segnale <sup>(2,3)</sup>. La regolazione delle ROS e RNS in vivo è quindi cruciale per la prevenzione e il controllo delle malattie, e l'obiettivo di domare questi radicali per scopi terapeutici è diventata una nuova sfida.

Il primo approccio in questa ricerca è stato l'uso di glutatione e di altri antiossidanti come i tocoferoli.

Quindi, l'applicazione terapeutica di SOD, prima contestata, è poi diventata un valido mezzo per questo scopo.

In particolare, per un effetto farmacologico continuo, è stato preparato, modificando il complesso Cu, Zn-SOD, un copolimero sintetico biocompatibile (DIVEMA, un copolimero di etere divinilico e anidride maleica, chiamato anche copolimero a basi di pirano). E' stato dimostrato che il copolimero piran-SOD ha un' emivita plasmatica di 10 volte superiore a quella della SOD native non modificata, ciò ha portato ad un significativo miglioramento contro l'infezione da influenza nei topi.

E' stato inoltre scoperto che DIVEMA esplica un'altra funzione, grazie ai propri residui bicarbossilici derivanti dall' acido maleico: chela il rame ed altri cationi bivalenti. Normalmente, lo ione  $\text{Cu}^{++}$  è liberato dalla Cu, Zn-SOD nella disintegrazione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  <sup>(4)</sup>.

DIVEMA è in grado di catturare gli ioni  $\text{Cu}^{++}$ , che sarebbero altrimenti pericolosi, perché porterebbero alla generazione di radicali ossidrilici attraverso la reazione di Fenton.

Recentemente, la tecnologia del DNA ricombinante ha permesso la produzione di molti enzimi antiossidanti come la SOD e l' eme ossigenasi-1. È pertanto opportuno rivedere gli interventi terapeutici che utilizzano queste proteine o enzimi o appropriati inibitori di ROS / RNS che generano enzimi che sono correlati con malattie indotte da radicali liberi endogeni.

Nel 1980, la scoperta di un altro radicale libero endogeno, l' ossido nitrico (NO) in vivo, ha avuto un grande impatto in fisiologia e patologia.

La reattività di NO è paragonabile a quella delle ROS e l' NO ha un ruolo fondamentale nel controllo del tono vascolare e nelle vie di segnale biologiche, attraverso l'attivazione della guanilato ciclasi, che ha una funzione ben precisa nella regolazione dei sistemi vitali.

E' ormai noto che la presenza di nitrito, a lungo termine può essere pericolosa. Alcuni autori hanno dimostrato che il nitrito essendo convertito in NO in vivo può funzionare come un antiossidante, e può portare benefici o prevenire alcune malattie.

A causa dell' andamento estremamente veloce della reazione, del radicale  $^{\circ}$  NO e  $O_2^{\cdot-}$ , le funzioni biologiche di NO sono influenzate in larga misura in presenza di  $O_2^{\cdot-}$  e NO è rapidamente consumato. Inoltre, il prodotto di reazione di NO e  $O_2^{\cdot-}$  [ONOO $^-$ ] è una RNS ad elevata potenza, e si traduce in nitrificazione e ossidazione delle proteine e degli acidi nucleici, quindi la reazione di ONOO $^-$  sono dannose per le cellule viventi.

Nel corso degli ultimi decenni, i progressi nella scoperta dei farmaci, del loro target del loro rilascio è stato notevole e il controllo delle ROS e delle RNS in varie malattie è ora garantito.

In uno studio è stato dimostrato <sup>(4)</sup> che si può, attraverso appropriate modificazioni chimiche, non solo aumentare il tempo di circolazione plasmatica degli agenti terapeutici, ma anche dirigere enzimi modificati chimicamente a specifici organi o tessuti.

L'effetto di aumentata permeabilità e ritenzione (EPR) può portare a farmaci che si liberano direttamente a livello dei tumori.

Il controllo del cancro e delle malattie infiammatorie può essere ottenuto sfruttando l'effetto che si basa sull' EPR.

Lo stress ossidativo ed i composti dell'eme inducono gli enzimi antiossidanti e le proteine, come le proteine da shock termico (HSP), a proteggere le cellule.

Gli enzimi antiossidanti delle cellule tumorali come la catalasi e SOD sono down-regolate, ma HO-1 (conosciuto anche come HSP-32) è per lo più up-regolato.

Il blocco di HO-1 rende le cellule tumorali più vulnerabili allo stress ossidativo, e le cellule tumorali, simili ai batteri anaerobici, hanno una sensibilità molto più elevata per H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in confronto alle cellule normali.

Per questo HO-1 può essere un valido target, e lo studio di induttori di Hsp come agenti terapeutici, acquista sempre maggiore importanza contro lo stress ossidativo indotto da stati di malattia.

Il suo effetto citoprotettivo può offrire una unica opzione terapeutica. Lo scopo principale delle nuove ricerche è quello di fornire nuove strategie terapeutiche per il trattamento di malattie nelle quali radicali liberi endogeni hanno conseguenze significative per lo sviluppo della malattia.